

**Cara uji mikrobiologi – Bagian 9:
Penentuan *Staphylococcus aureus* pada produk perikanan**





© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Daftar Isi	i
Prakata	ii
1 Ruang Lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi	1
3 Penentuan <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) dengan metode cawan hitung (<i>Plate Count</i>) agar sebar.....	2
4 Penentuan <i>S. aureus</i> dengan metode Angka Paling Memungkinkan (APM)	6
5 Keamanan dan keselamatan kerja	8
Lampiran A	9
Lampiran B	11
Lampiran C	13
Lampiran D	15
Lampiran E	16
Bibliografi	17
Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji.....	3
Tabel 2 - Karakteristik yang khas dari <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> dan <i>Micrococci</i>	5
Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^1 , 10^2 dan 10^3	10
Gambar 1 - Tipe Reaksi Uji Koagulase	4
Gambar D.1 - Skema penentuan <i>S. aureus</i> dengan metode cawan hitung (<i>plate count</i>) agar sebar.....	15
Gambar E.1 - Skema penentuan <i>S. aureus</i> dengan metode APM (Angka Paling Memungkinkan)	16

Prakata

Dalam rangka memberikan jaminan mutu dan keamanan pangan terhadap komoditas produk perikanan yang akan dipasarkan di dalam dan di luar negeri, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji yang dapat memenuhi jaminan tersebut.

Standar ini merupakan revisi dari:

SNI 2332.9:2011, *Cara uji mikrobiologi – Bagian 9 : Penentuan Staphylococcus aureus pada produk perikanan.*

Bagian yang di revisi adalah menyempurnakan isi dari metode pengujian *Staphylococcus aureus*.

Standar ini disusun oleh Komite Teknis: 65-05 Produk Perikanan yang telah dirumuskan melalui rapat teknis dan rapat konsensus pada tanggal 20 Oktober 2014 di Jakarta dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-05: Produk Perikanan untuk meningkatkan jaminan mutu dan keamanan pangan.

Berkaitan dengan penyusunan SNI ini, maka aturan yang dijadikan dasar atau pedoman adalah Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.019/MEN/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 15 Januari 2015 sampai dengan 16 Maret 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Cara uji mikrobiologi – Bagian 9: Penentuan *Staphylococcus aureus* pada produk perikanan

1 Ruang Lingkup

Standar ini digunakan untuk menentukan jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan metode cawan sebar untuk produk perikanan yang diduga mengandung bakteri dengan populasi lebih dari 100 koloni/g atau menggunakan metode Angka Paling Memungkinkan (APM) untuk produk perikanan yang diduga mengandung bakteri dengan populasi kurang dari 100 koloni/g.

2 Istilah dan definisi

2.1

Staphylococcus aureus

bakteri Gram-positif dengan diameter 0,5 μm - 1,0 μm berbentuk bulat (kokus) yang berkelompok seperti rangkaian buah anggur, tidak membentuk spora dan tidak bergerak

2.2

inkubasi

pengkondisian mikroorganisme untuk tumbuh dan berkembang biak sesuai dengan media, suhu dan waktu yang diperlukan

2.3

uji koagulase

uji yang digunakan untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari koagulase negatif staphylococci

2.4

koloni

mikroorganisme yang tumbuh pada media biakan padat yang dapat dilihat secara visual

2.5

metode Angka Paling Memungkinkan/APM

metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi, menggunakan 3 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik

2.6

metode cawan hitung (*plate count*) agar sebar

metode yang menggunakan media agar steril yang dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan membeku, kemudian contoh disebar diatas permukaan media agar tersebut

2.7

produk perikanan

ikan termasuk biota perairan lainnya yang ditangani dan/atau diolah untuk dijadikan produk akhir yang berupa ikan segar, ikan beku dan olahan lainnya yang digunakan untuk konsumsi manusia

3 Penentuan *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar

3.1 Prinsip

Metode cawan hitung agar sebar dengan cara menuangkan media *baird parker* agar ke dalam cawan petri steril, biarkan membeku, kemudian contoh sebanyak 1 mL disebar diatas permukaan media. Konfirmasi koloni terduga *S. aureus* dilakukan dengan uji koagulase dan uji tambahan. Metode ini sesuai untuk menganalisis produk perikanan yang diduga mengandung *S. aureus* lebih dari 100 koloni/g.

3.2 Peralatan

- autoclave;
- alat penghitung koloni;
- alat timbang analitik dengan ketelitian $\pm 0,0001$ g;
- alat timbang dengan ketelitian $\pm 0,1$ g;
- botol pengencer 20 mL;
- blender beserta jar yang dapat disterilisasi atau *stomacher*;
- batang gelas bengkok diameter 3 mm – 4 mm, dengan panjang tangkai 15 cm – 20 cm;
- cawan petri 15 mm x 90 mm;
- gelas ukur 250 mL;
- gelas preparat;
- inkubator $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- membran aparatus;
- membran filter;
- pipet gelas atau pipetor 0,1 mL dan 1 mL;
- pipet pasteur;
- *waterbath*.

3.3 Media dan pereaksi

- *baird parker* agar (B.1);
- *brain heart infusion broth* (B.2);
- *coagulase plasma (rabbit)* dengan EDTA;
- *egg yolk-tellurite*;
- larutan *Butterfield's phosphate buffer* (C.1);
- *parafin oil* steril;
- pereaksi katalase (3% H_2O_2) (C.2);
- pereaksi pewarnaan Gram (C.3);
- *purple carbohydrate broth* (masing-masing mengandung *glucose* dan *manitol* 0,5%) (B.3);
- *toluidine blue* - DNA agar (B.4);
- *trypticase (tryptic) soy agar* (B.5).

CATATAN: Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran B dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran C.

3.4 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknik aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau laminar *air flow* yang kontaminasinya terkontrol. Media *baird parker* agar yang akan digunakan harus dalam keadaan kering. Bila koloni *S. aureus* belum tumbuh dengan baik setelah 48 jam, inkubasi dapat dilanjutkan sampai 72 jam.

3.5 Penyiapan contoh

Dengan menerapkan teknis aseptis, contoh diambil secara acak dan dipotong kecil-kecil hingga berat masing-masing contoh yang akan diuji sesuai dengan ketentuan pada Tabel 1.

Contoh beku dilelehkan pada saat akan dianalisis dan pelelehan dilakukan selama 18 jam pada suhu sekitar 2 °C – 5 °C atau suhu di bawah 45 °C dan tidak lebih dari 15 menit.

Tabel 1 - Berat contoh yang diambil yang akan diuji

Berat contoh	Berat contoh yang akan diuji
< 1 kg atau 1 L	100 g atau 100 mL
1 kg atau 1 L – 4,5 kg atau 4,5 L	300 g atau 300 mL
> 4,5 kg atau 4,5 L	500 g atau 500 mL

3.6 Prosedur

3.6.1 Untuk contoh dengan berat lebih kecil atau sama dengan 1 kg atau 1 L sampai dengan 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 25 g atau contoh cair sebanyak 25 mL dari contoh yang akan diuji, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 225 mL larutan *Butterfield's phosphate buffer*.

3.6.2 Untuk contoh dengan berat lebih besar dari 4,5 kg atau 4,5 L timbang contoh padat sebanyak 50 g atau contoh cair sebanyak 50 mL, kemudian masukkan dalam wadah atau plastik steril dan tambahkan 450 mL larutan *Butterfield's phosphate buffer*.

3.6.3 Homogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran 10^1 . Dengan menggunakan pipet steril, ambil 1 mL homogenat dan masukkan ke dalam 9 mL larutan *butterfield's phosphate buffer* untuk mendapatkan pengenceran 10^2 . Siapkan pengenceran selanjutnya (10^3) dengan mengambil 1 mL contoh dari pengenceran 10^2 ke dalam 9 mL larutan *butterfield's phosphate buffer*. Pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan minimal 25 kali. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran 10^4 , 10^5 , dan seterusnya sesuai kondisi contoh.

3.6.4 Isolasi *S. aureus*

- Secara aseptis pindahkan 1 mL dari setiap pengenceran $10^1, 10^2$, dst. Masukkan dalam 3 cawan masing-masing (0,4 mL; 0,3 mL; 0,3 mL) yang sudah berisi media *baird parker agar*.
- Ratakan inokulum pada permukaan agar dengan menggunakan batang gelas bengkok dan biarkan inokulum sampai terserap ke dalam media kira kira 10 menit dalam media *baird parker agar* kering. Bila inokulum belum terserap, letakkan cawan dalam inkubator dengan posisi menghadap ke atas sekitar 1 jam. Balik cawan petri dan inkubasi selama 45 jam - 48 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
- Koloni *S. aureus* pada *Baird Parker Agar* mempunyai ciri-ciri: koloni bundar, licin/halus, cembung, diameter 2 mm - 3 mm, warna abu - abu hingga kehitaman, sekeliling tepi koloni bening (terbentuk *halo*). Koloni-koloni mempunyai konsistensi berlemak dan lengket bila diambil dengan jarum inokulasi.

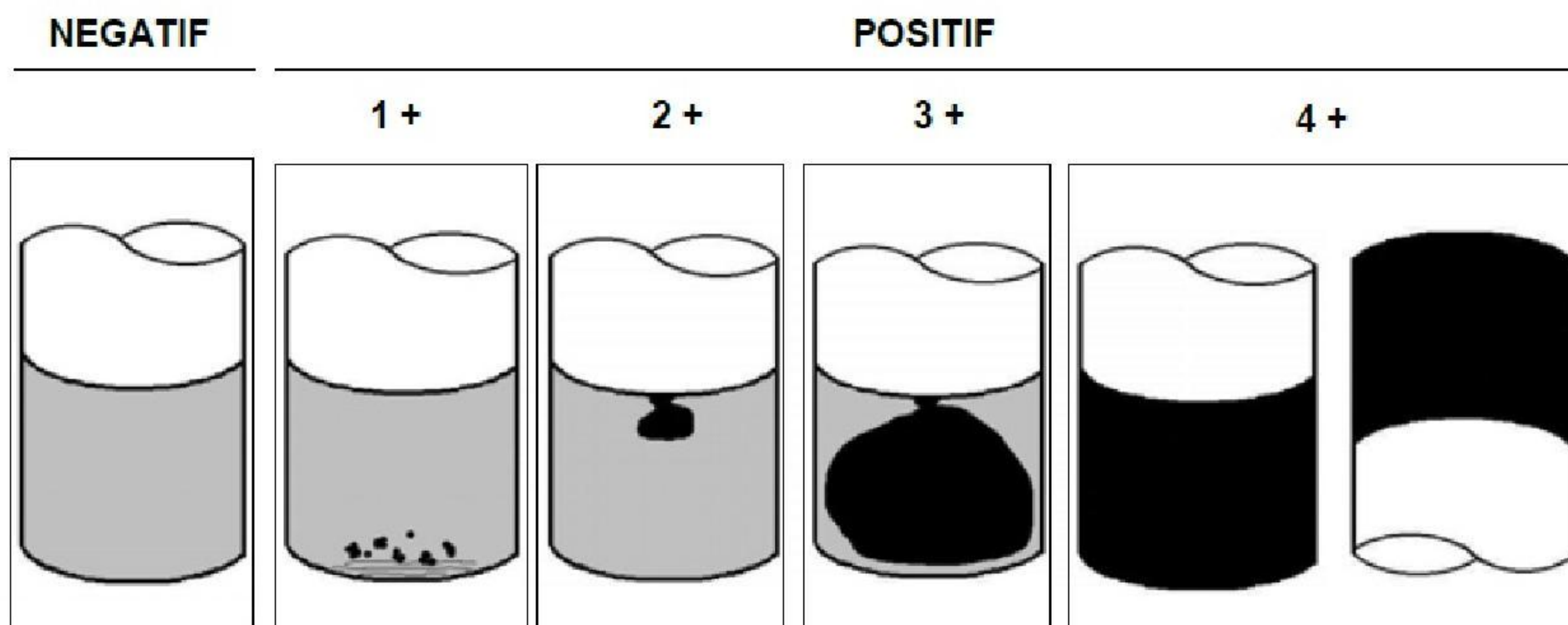
CATATAN 2: *Strains* yang berasal dari makanan beku atau makanan kering yang sudah lama disimpan, sering memberikan warna yang kurang hitam dibandingkan dengan koloni yang khas *S. aureus*. Selain itu kenampakan koloni juga kasar dan teksturnya kering.

3.6.5 Perhitungan koloni

- Pilih cawan petri yang mempunyai jumlah koloni 20 – 200, kecuali jika pada pengenceran yang terendah mempunyai jumlah koloni lebih besar dari 200 koloni. Hitung dan catat jumlah koloni.
- Bila terdapat beberapa jenis koloni yang terlihat seperti *S. aureus* pada cawan petri, hitung masing-masing jenis tersebut dan catat hasil perhitungannya secara terpisah.
- Jika cawan petri pada pengenceran terendah berisi kurang dari 20 koloni, data koloni dapat digunakan.
- Bila terdapat cawan yang berisi lebih dari 200 koloni dengan ciri-ciri *S. aureus* dan pada pengenceran yang lebih tinggi tidak ditemukan koloni, maka gunakan cawan tersebut untuk menghitung *S. Aureus*.
- Ambil 2 atau lebih koloni terduga untuk uji koagulase dan uji tambahan.

3.6.6 Uji koagulase

- Inokulasi koloni terduga *S. aureus* ke dalam 2 mL BHI broth dan inkubasi 18 jam – 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
- Pindahkan 0,2 mL - 0,3 mL inokulum tersebut ke dalam tabung steril dan tambahkan 0,5 mL koagulase plasma yang sudah ditambah EDTA kemudian aduk. Inkubasi pada suhu (35 ± 1) °C. Amati tiap jam untuk 4 jam pertama dan lanjutkan hingga 24 jam untuk melihat terbentuknya koagulan.
- Koagulan yang terbentuk secara padat/solid dan tidak jatuh apabila tabung dibalik dinyatakan positif (reaksi 4+) *S. aureus*. Koagulan yang menunjukkan reaksi 2+ dan 3+ harus dilakukan uji tambahan. Tipe reaksi uji koagulase dapat dilihat pada Gambar 1.



Negatif: Jika koagulan tidak terbentuk.

1 + Positif : Jika koagulan tidak terkumpul dan sedikit.

2 + Positif : Jika koagulan terkumpul dibagian atas dan sedikit.

3 + Positif : Jika koagulan terkumpul dibagian bawah dan banyak.

4 + Positif : Jika koagulan pada tabung dibalik tidak jatuh.

Gambar 1 - Tipe Reaksi Uji Koagulase

- Jika diperlukan uji koagulase yang lebih cepat, dapat menggunakan uji aglutinasi lateks

3.6.7 Uji Tambahan

3.6.7.1 Uji Katalase

- Ambil 1 ose inokulum dari BHI *broth* (3.6.6.a) goreskan ke dalam media TSA miring dan inkubasi selama 18 jam – 24 jam pada suhu (35 ± 1) °C.
- Setelah diinkubasi ambil 1 ose inokulum tersebut dan letakkan diatas gelas preparat, tetesi dengan H₂O₂ untuk melihat pembentukan gelembung-gelembung gas.

3.6.7.2 Fermentasi glukosa secara anaerob

- Ambil 1 ose inokulum dari BHI *broth* (3.6.6.a). Inokulasikan ke tabung reaksi yang berisi media karbohidrat mengandung 0,5% glukosa, tutup lapisan atas dengan paraffin oil steril setebal 25 mm.
- Inkubasi selama 5 hari pada suhu 37 °C. Kondisi asam dihasilkan secara anaerob jika terjadi perubahan warna media dari ungu menjadi kuning, ini menunjukkan adanya *S. aureus*.

3.6.7.3 Fermentasi manitol secara anaerob

Lakukan seperti no. 3.6.7.2 di atas. Gunakan manitol sebagai karbohidrat dalam media. *S. aureus* biasanya memberikan hasil positif yang ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna dari ungu ke kuning, tetapi beberapa strain memberikan hasil negatif.

3.6.7.4 Uji produksi nuklease thermostabil

- Tuang 3 ml *toluidine blue*-DNA agar diatas permukaan gelas preparat. Setelah media agar tersebut membeku, buat lubang dengan diameter 2 mm.
- Ambil 0,01 ml kultur BHI *broth* (3.6.6.a) yang telah dipanaskan dalam *waterbath* mendidih pada suhu 100 °C selama 15 menit
- Letakkan gelas preparat pada kondisi yang lembab dan inkubasi selama 4 jam pada suhu 35 °C. Apabila terbentuk lingkaran berwarna merah muda cerah di sekeliling lubang sekurang-kurangnya 1 mm, menunjukkan reaksi positif.

CATATAN : Uji produksi nuklease thermostabil tidak dapat menggantikan uji koagulase tetapi hanya digunakan untuk mendukung pengujian yang memberikan reaksi koagulase 2+. Pada uji ini terjadi perubahan warna dari biru menjadi merah muda cerah.

Karakteristik *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2 - Karakteristik yang khas dari *S. aureus*, *S. epidermidis* dan *Micrococci*

Karakteristik	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococci</i>
Uji Katalase	+	+	+
Uji Koagulase	+	-	-
Uji Produksi Nuklease	+	+	-
Fermentasi secara Anaerob			
- Glukosa	+	+	-
- Manitol	+	-	-
Catatan + : Mayoritas (90% atau lebih) strains adalah positif - : Mayoritas (90% atau lebih) strains adalah negatif			

3.6.8 Pelaporan *S. aureus* dengan metode cawan hitung (*Plate Count*) agar sebar

Dari setiap pengenceran, jumlahkan koloni-koloni pada ketiga cawan petri yang memberikan hasil koagulase atau uji tambahan positif kemudian kalikan dengan faktor pengencerannya.

Laporkan hasilnya sebagai jumlah *S. aureus* per gram produk.

- Untuk menghasilkan perhitungan yang akurat dan teliti, maka laporkan hasilnya dengan dua angka (digit) pertama sebagai hasil pembulatan.
- Bulatkan keatas dengan cara menaikkan angka kedua menjadi angka yang lebih tinggi, bila angka ketiga adalah > 5 maka gunakan angka 0 untuk masing-masing angka pada digit berikutnya.
- Bulatkan ke bawah bila angka ketiga adalah < 5 . Bila angka ketiga 5, bulatkan ke atas bila angka kedua ganjil, dan bulatkan ke bawah bila angka kedua itu genap.

Contoh 1

Hasil Perhitungan		<i>S. aureus</i>
12.700	menjadi	13.000
12.400	menjadi	12.000
15.500	menjadi	16.000
14.500	menjadi	14.000

4 Penentuan *S. aureus* dengan metode Angka Paling Memungkinkan (APM)

4.1 Prinsip

Metode APM menumbuhkan bakteri pada media cair dalam tabung reaksi. Menggunakan 3 tabung seri pengenceran setelah diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Tabung yang menunjukkan kekeruhan diinokulasi kedalam media *Baird Parker Agar*. Konfirmasi koloni terduga *S. aureus* dilakukan dengan uji koagulase dan uji tambahan. Metode ini sesuai untuk pengujian rutin pada produk yang diduga mengandung jumlah *S. aureus* dengan populasi rendah.

4.2 Peralatan

- autoclave;
- alat penghitung koloni;
- alat timbang analitik dengan ketelitian $\pm 0,0001$;
- alat timbang dengan ketelitian $\pm 0,1$ g;
- botol pengencer 20 mL;
- blender beserta Jar yang dapat disterilisasi atau stomacher;
- cawan petri 15 mm x 90 mm;
- gelas ukur 250 mL;
- gelas preparat;
- inkubator (35 \pm 1) °C;
- jarum Ose (diameter 3 mm);
- membran aparatus;
- membran filter;
- pipet gelas atau pipetor 0,1 mL dan 1 mL;
- pipet pasteur;
- tabung reaksi;
- waterbath.

4.3 Media dan pereaksi (Lampiran B dan C)

- *Baird Parker agar* (B1);
- *brain heart infusion broth* (B2);
- *coagulase plasma (Rabbit)* dengan EDTA;
- *egg yolk-tellurite*
- larutan *Butterfield's phosphate buffer* (C 1);
- *purple carbohydrate broth* (masing-masing mengandung glucose dan manitol 0,5%) (B 3);
- *parafin oil* steril;
- pereaksi katalase (3% H₂O₂) (C 2);
- pereaksi pewarnaan gram (C 3);
- *toluidine blue- DNA Agar* (B 4);
- *trypticase (tryptic) soy agar* (B 5);
- *trypticase/tryptic soy broth* (TSB) mengandung 10% NaCl dan 1% *sodium pyruvat* (B 6);

CATATAN: Pembuatan media diuraikan dalam Lampiran B dan pembuatan pereaksi diuraikan dalam Lampiran C.

4.4 Kondisi pengujian

Selama melakukan pengujian, terapkan teknik aseptis dan lakukan pengujian di ruangan atau laminar air flow yang kontaminasinya terkontrol. Media *Baird Parker agar* yang akan digunakan harus dalam keadaan kering. Bila koloni *S. aureus* belum tumbuh dengan baik setelah 48 jam, inkubasi dapat dilanjutkan sampai 72 jam.

4.5 Preparasi contoh

Preparasi contoh sesuai dengan Tabel 1.

4.6 Prosedur

4.6.1 Lakukan prosedur 3.6.1 sampai dengan 3.6.3.

4.6.2 Determinasi *S. aureus*

- a) Ambil 1 mL dari setiap pengenceran ($10^1, 10^2$, dan seterusnya) dan inokulasikan ke dalam 3 seri tabung TSB yang mengandung 10% NaCl dan 1% *sodium piruvat*. Inkubasi pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam.
- b) Pilih tabung yang menunjukkan kekeruhan pada setiap pengenceran dan lakukan pengocokan kemudian goreskan sebanyak 1 jarum Ose dengan diameter 3 mm ke permukaan media *Baird Parker Agar*. Inkubasi pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam.
- c) Pada setiap cawan yang diduga mengandung *S. aureus*, pindahkan sekurang-kurangnya 1 koloni dari setiap cawan ke BHI broth, inkubasi pada suhu 35 °C selama (24 ± 2) jam.
- d) Koloni *S. aureus* pada *Baird Parker Agar* mempunyai ciri-ciri: bundar, licin/halus, cembung, diameter 2 mm - 3 mm, warna abu-abu hingga kehitaman, sekeliling tepi koloni bening (terbentuk *halo*). Koloni-koloni mempunyai konsistensi berlemak dan lengket bila diambil dengan jarum inokulasi.
- e) Lakukan uji koagulase sesuai 3.6.6, dan uji tambahan sesuai 3.6.4.

CATATAN 3: *Strains* yang berasal dari makanan beku atau makanan kering yang sudah lama disimpan, sering memberikan warna yang kurang hitam dibandingkan dengan koloni yang khas *S. aureus*. Selain itu kenampakan koloni juga kasar dan teksturnya kering.

4.6.3 Pelaporan *S. aureus* dengan metode APM

Berdasarkan jumlah seri tabung positif dari setiap pengenceran yang memberikan reaksi spesifik *S. aureus* pada uji koagulase atau uji tambahan, laporkan hasil *S. aureus* dalam APM/g dengan menggunakan tabel Angka Paling Memungkinkan (APM) berdasarkan Lampiran A.

Berdasarkan interpretasi hasil di atas, nyatakan *S. aureus* dengan menggunakan Angka Paling Memungkinkan (APM)

5 Keamanan dan keselamatan kerja

Untuk menjaga keamanan dan keselamatan kerja selama melakukan analisis maka perlu diperhatikan hal-hal sebagai berikut:

- Cuci tangan sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- Gunakan jas laboratorium selama melakukan analisis.
- Lakukan analisis di dalam laminar *air flow*.
- Bersihkan meja kerja sebelum dan sesudah melakukan analisis.
- Bersihkan segera contoh yang tumpah dan mengandung bakteri dengan menggunakan bahan desinfektan.
- Media yang sudah digunakan disterilkan terlebih dahulu sebelum dicuci.



Lampiran A
(normatif)
Angka paling memungkinkan (APM) dengan seri tabung pengenceran

A.1 Latar belakang

Metode untuk menduga jumlah bakteri dalam suatu produk, dapat menggunakan metode hitungan mikroskopis, metode hitungan cawan dan penentuan Angka Paling Memungkinkan (APM). Organisme yang mati maupun hidup dapat dihitung dengan metode hitungan mikroskopis, akan tetapi pada APM hanya organisme hidup yang dapat dihitung.

Metode APM adalah metode untuk menghitung jumlah mikroba dengan menggunakan media cair dalam tabung reaksi yang pada umumnya setiap pengenceran menggunakan 3 seri tabung dan perhitungan yang dilakukan merupakan tahap pendekatan secara statistik. Tabung positif ditunjukkan oleh adanya pertumbuhan bakteri dan gas. Nilai APM ini diperoleh dengan anggapan sebagai berikut:

- a) Bakteri dalam contoh menyebar secara random.
- b) Bakteri dalam contoh tidak berkelompok atau kluster, tetapi saling terpisah.
- c) Organisme yang terdapat dalam contoh dapat tumbuh dalam media selama inkubasi.
- d) Kondisi yang sesuai untuk pertumbuhan seperti media, suhu dan waktu inkubasi.

Di dalam penggunaan seri tabung pengenceran tingkat pengenceran yang diperlukan didasarkan pada pendugaan populasi bakteri yang ada dalam contoh. Hasil yang baik adalah jika pada pengenceran yang lebih rendah contoh yang diduga lebih banyak menunjukkan hasil uji positif (adanya pertumbuhan bakteri) dan pada pengenceran lebih tinggi contoh yang diduga lebih sedikit menunjukkan hasil uji negatif (tidak ada pertumbuhan bakteri). Oleh karena itu jumlah populasi bakteri yang ada dalam contoh diduga tinggi maka contoh harus diencerkan sampai diperoleh tingkat pengenceran yang lebih tinggi sehingga nilai APM maksimum yang dapat dihitung. Metode pengenceran yang paling mudah adalah dengan melakukan pengenceran 10 kali lipat dengan menggunakan 3 seri tabung pengenceran.

Metode APM digunakan untuk menduga organisme dalam jumlah sedikit (kurang dari 100/g) terutama susu, air dan makanan yang mempunyai partikel-partikel lain yang mungkin mengganggu keakurasian perhitungan. Kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh cukup untuk memberikan hasil yang signifikan dan umumnya terdapat dalam Tabel APM, sedangkan kombinasi yang tidak mungkin, diabaikan. Tabel APM mempunyai tingkat kepercayaan 95%. Jika kombinasi tabung-tabung positif yang diperoleh tidak termasuk dalam tabel APM maka contoh harus dilakukan pengujian kembali.

Tabel A.1 - Indeks APM dengan tingkat kepercayaan 95% untuk berbagai kombinasi hasil positif dari 3 seri tabung pada pengenceran 10^1 , 10^2 dan 10^3

Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan		Tabung positif			APM/g	Tk. Kepercayaan	
0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas	0.1	0.01	0.001		Bawah	Atas
0	0	0	<3.0	—	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	
SUMBER Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions, October 2010											

Lampiran B
(normatif)
Pembuatan media

B.1 Baird Parker agar**Media Basal**

<i>Tryptone</i>	10 g
<i>Beef Extract</i>	5 g
<i>Yeast Extract</i>	1 g
<i>Sodium piruvat</i>	10 g
<i>Glicine</i>	12 g
<i>Lithium Chloride 6H₂O</i>	5 g
<i>Agar</i>	20 g

Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,0 – 0,2). Jika langsung akan digunakan, dinginkan media suhu 48 °C – 50 °C sebelum penambahan media pengkayaan. Media dapat disimpan pada suhu (4 – 1) °C selama 1 bulan dan lelehkan sebelum digunakan.

Media pengkayaan : *Bacto EY tellurite enrichment*.

Media kerja: Tambahkan 5 mL *Bacto EY tellurite enrichment* ke dalam 95 mL media basal yang telah dilelehkan 45 °C – 50 °C. Aduk hingga homogen (hindari gelembung), tuang sebanyak 10 mL – 15 mL ke dalam cawan petri steril. Keringkan media sebelum digunakan.

B.2 Brain heart infusion broth agar

<i>Calf brain infusion</i>	200 g
<i>Beef heart infusion</i>	250 g
<i>Proteose peptone or gelysate</i>	10 g
<i>NaCl</i>	5 g
<i>Na₂HPO₄.12H₂O</i>	2,5 g
<i>Dextrose</i>	2 g
<i>Aquades</i>	1000 mL

Larutkan semua bahan dalam aquades dan panaskan perlahan-lahan. Masukkan ke dalam botol atau tabung untuk disimpan. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,4 – 0,1). Untuk persiapan BHI Agar, tambahkan 15 g agar ke dalam 1000 mL BHI broth. Panaskan untuk melarutkan agar sebelum dimasukkan ke dalam botol atau labu. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit, pH akhir (7,2 – 0,1).

B.3 Purple carbohydrate broth

Proteose peptone No. 3
Beef extract
NaCl
Bromcresol Purple
Aquades
*Karbohidrat **

- * Siapkan *glukosa* dan *manitol* stock masing-masing 5% dengan menimbang 5 g glukosa dalam 100 mL aquades dan 5 g manitol dalam 100 mL aquades. Homogenkan dan steril dengan membran filter. Tambahkan 0,5 mL larutan stock *glucose* 5% kedalam 4,5 mL media basal *Purple Broth Base* dan 0,5 mL larutan stock *manitol* 5% kedalam 4,5 mL media basal *Purple Broth Base* untuk menghasilkan 0,5% larutan karbohidrat.

B.4 *Toluidine blue* - DNA Agar

<i>Dioxyribonucleic Acid</i> (DNA)	0,3 g
Agar	10 g
CaCl ₂ (<i>anhydrous</i>)	1,1 mg
NaCl	10 g
<i>Toluidine blue O</i>	0,083 g
<i>Tris</i> (<i>hidroxymethyl</i>) <i>aminomethane</i>	6,1 g
Aquades	1000 mL

Larutkan *tris Aminomethane* dalam 1 liter aquades. Atur pH menjadi 9,0. Tambahkan bahan-bahan lainnya kecuali *Toluidine blue O* dan panaskan hingga mendidih. Larutkan *Toluidine blue O* dalam media tersebut dan masukkan ke dalam labu bertutup karet. Sterilisasi tidak diperlukan jika media langsung digunakan. Media steril stabil pada temperatur ruang selama 4 bulan.

B.5 *Trypticase* (*tryptic*) soy agar

<i>Trypticase peptone</i>	15 g
<i>Tryptone peptone</i>	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Aquades	1000 mL

Larutkan semua bahan dan didihkan. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2).

B.6 *Trypticase* (*tryptic*) soy broth with 10% NaCl dan 1% sodium piruvat

<i>Trypticase</i> atau <i>tryptose</i> (<i>pancreatic digest of casein</i>)	17 g
<i>Phytone</i> (<i>papaic digest of soya meal</i>)	3 g
NaCl	100 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
<i>Dextrose</i>	2,5 g
<i>Sodium piruvat</i>	10 g
Aquades	1000 mL

Larutkan *trypticase* atau *tryptose soy broth* dengan 95 g NaCl dan 10 g *sodium piruvat* dalam 1 liter aquades. Atur pH akhir 7,3. Panaskan jika perlu. Tuang 10 mL ke dalam tabung reaksi ukuran 16 mm x 150 mm. *Autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit. Atur pH akhir (7,3 ± 0,2). simpan tidak lebih dari 1 bulan pada suhu (4 ± 1) °C.

Lampiran C
(normatif)
Pembuatan pereaksi

C.1 Larutan *Butterfield's phosphate buffer*

Larutan stok

KH ₂ PO ₄	34 g
Aquades	500 mL

Atur pH 7.2 dengan 1 N NaOH. Tepatkan volume larutan tersebut hingga 1 000 mL dengan penambahan aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan dalam refrigerator.

Larutan kerja

Pipet 10 mL larutan stok dan tepatkan hingga 1 000 mL dengan penambahan aquades. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit

C.2 Uji katalase

Tetesi kultur agar miring dengan 3 % H₂O₂ terbentuknya gelembung menunjukkan uji positif. Cara lain, emulsikan kultur di atas gelas preparat dan tetesi dengan 3 % H₂O₂.

C.3 Pereaksi pewarnaan Gram

Hucker's crystal violet

Larutan A

<i>Crystal violet</i>	2 g
<i>Ethyl alcohol</i> , 95 %	20 mL

Larutan B

<i>Ammonium oxalat</i>	0,8 g
Aquades	2 g

Campur larutan A dan B. Simpan selama 24 jam dan saring dengan kertas saring.

Gram's Iodine

<i>Iodine</i>	1 g
<i>Potassium iodine</i>	2 g
Aquades	300 g

Masukkan KI dalam mortar, tambahkan *iodine* dan gerus dengan alat penggiling selama 5 detik - 10 detik. Tambahkan 1 mL air dan gerus kemudian tambahkan 5 mL air. Tambahkan lagi 10 mL dan gerus. Tuang larutan ini dalam botol reagen. Bilas mortar dan alat penggerusnya dan tambahkan air hingga volume 300 mL.

***Hucker's Counterstain* (larutan stok)**

<i>Safranin O</i>	2,5 g
<i>Ethanol</i> , 95%	100 mL

Larutan stock :

larutkan *Safranin O* 2,5 g kedalam *Ethanol* 95% 100 mL

Larutan kerja:

larutkan 10 mL larutan stok ke dalam 90 mL aquades

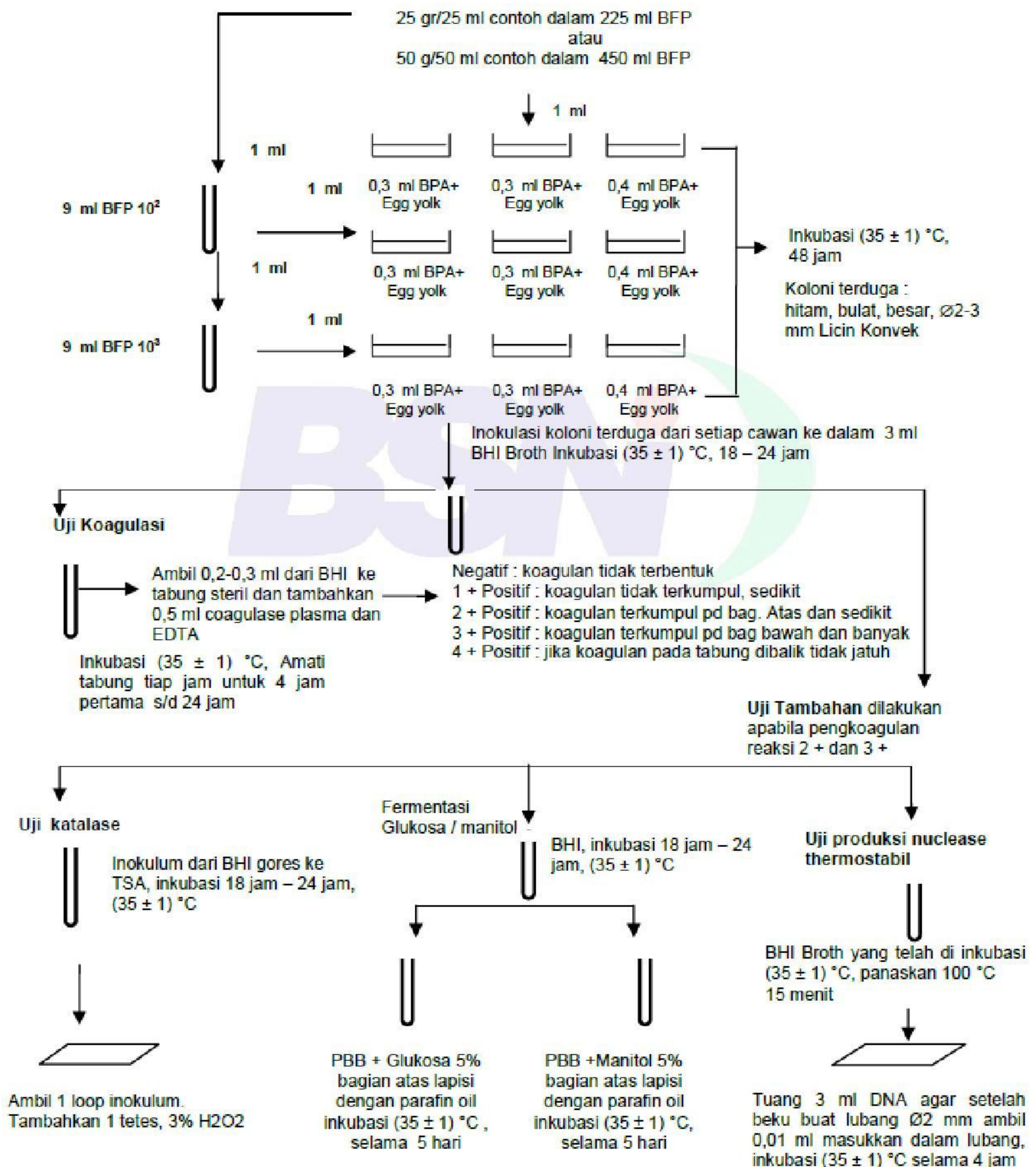
Prosedur pewarnaan:

Buat usapan bakteri yang akan diwarnai diatas gelas preparat. Usahkan usapan yang dibuat setipis mungkin. Fiksasi gelas preparat tersebut dengan melewati melalui apiburner. Warnai film selama 1 menit dengan larutan *Hucker's crystal violet* dan cuci sebentar dengan air. Bubuhkan larutan gram's *iodine* selama 1 menit. Cuci dengan air mengalir. Lakukan dekolorisasi (penghilangan warna) dengan *ethanol* 95% hingga seluruh warna biru hilang (kira-kira 30 detik). Cuci kembali dengan air mengalir. Bubuhkan larutan *Hucker's counterstain* (safranin) selama 1 menit dan cuci kembali dengan air mengalir, keringkan dan periksa dibawah mikroskop.



Lampiran D (informatif)

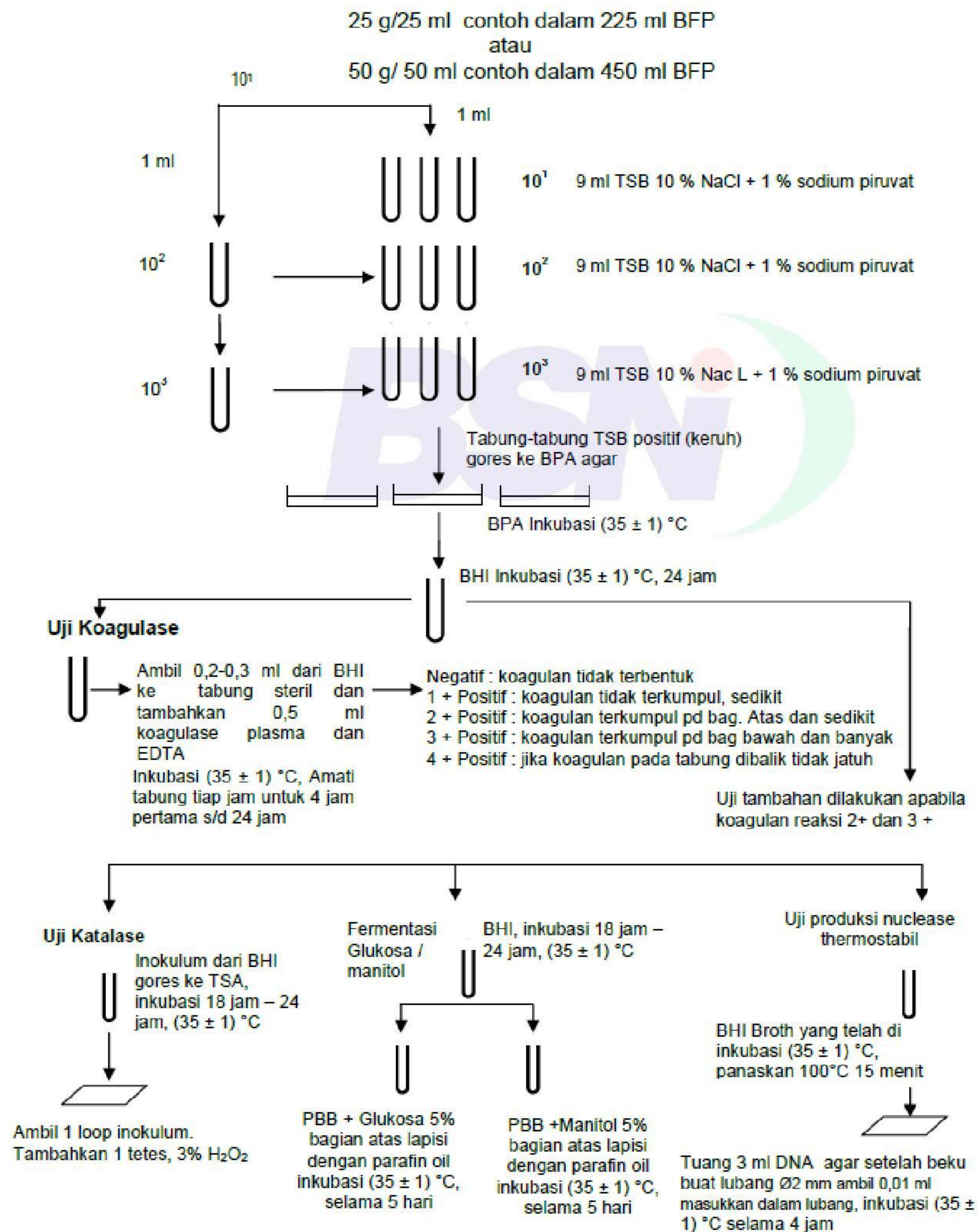
Skema penentuan *S. aureus* dengan metode cawan hitung (*plate count*) agar sebar



Gambar D.1 - Skema penentuan *S. aureus* dengan metode cawan hitung (*plate count*) agar sebar

Lampiran E

(normatif)

Skema penentuan *S. aureus* dengan metode APM (Angka Paling Memungkinkan)Gambar E.1 - Skema penentuan *S. aureus* dengan metode APM (Angka Paling Memungkinkan)

Bibliografi

Australian Standard. AS 1766.2.4. – 1994. Method 2.4: Examination for spesific organisms- Coagulase-positive staphylococci.

Food and Drug Administration Bacteriological Analitical Manual. 8th edition, 2001. Chapter 12. AOAC International.

Sperber, W.H., and S.R. Tatini. 1975. Interpretation of the tube coagulase test for identification of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol. 29:502-505.

